



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(15) Classification internationale des brevets⁴ : C12N 15/00, C12P 21/02 C12N 1/20 // (C12N 1/20 C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 85/ 02624 (43) Date de publication internationale: 20 juin 1985 (20.06.85)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR84/00287 (22) Date de dépôt international: 5 décembre 1984 (05.12.84) (31) Numéro de la demande prioritaire: 83/19777 (32) Date de priorité: 9 décembre 1983 (09.12.83) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE SA. [FR/FR]; 95, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : SONDER-MEYER, Paul [NL/FR]; 24, rue des Acacias, F-67400 Ostwald (FR). COURTNEY, Michael [GB/FR]; 18, rue du Ballon, F-67100 Strasbourg (FR). TESSIER, Luc-Henri [FR/FR]; 20, rue du Vieux Marché aux Grains, F-67000 Strasbourg (FR). LECOCQ, Jean-Pierre [BE/FR]; 6, rue du Champ du Feu, F-67116 Reichsteet (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: DK, JP, US. Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>

(54) Title: VECTOR FOR THE CLONING AND EXPRESSION OF γ -INTERFERON, TRANSFORMED BACTERIA AND PROCESS FOR THE PREPARATION OF γ -INTERFERON

(54) Titre: VECTEURS DE CLONAGE ET D'EXPRESSION DE L'INTERFERON- γ , BACTERIES TRANSFORMEES ET PROCEDE DE PREPARATION DE L'INTERFERON- γ

[illegible]

(57) Abstract

Disclosed is a vector for the expression of the mature protein of γ -interferon in bacteria of the type comprising the gene coding for the mature protein of human γ -interferon and the plasmidic elements providing for the expression of said gene characterized in that the end (5') of the sequence coding for the mature protein is as follows:

5' ATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC 3'
TAC ACG ATG ACA GTC CTA GGG
Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro.

The bacteria transformed by said vectors enable to produce IFN- γ with high yields

(57) Abrégé Vecteur d'expression de la protéine mature de l'interféron- γ dans les bactéries du type comportant le gène codant pour la protéine mature de l'interféron- γ humain et les éléments plasmidiques assurant l'expression de ce gène caractérisé en ce que l'extrémité 5' de la séquence codant pour la protéine mature est la suivante

5' ATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC 3'
TAC ACG ATG ACA GTC CTA GGG
Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro.

Les bactéries transformées par ces vecteurs permettent de produire IFN- γ avec des rendements élevés.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	KR	République de Corée
AU	Australie	LI	Liechtenstein
BE	Belgique	LK	Sri Lanka
BG	Bulgarie	LU	Luxembourg
BR	Brésil	MC	Monaco
CF	République Centrafricaine	MG	Madagascar
CG	Congo	MR	Mauritanie
CH	Suisse	MW	Malawi
CM	Cameroun	NL	Pays-Bas
DE	Allemagne, République fédérale d'	NO	Norvège
DK	Danemark	RO	Roumanie
FI	Finlande	SD	Soudan
FR	France	SE	Suède
GA	Gabon	SN	Sénégal
GB	Royaume-Uni	SU	Union soviétique
HU	Hongrie	TD	Tchad
JP	Japon	TG	Togo
KP	République populaire démocratique de Corée	US	Etats-Unis d'Amérique

Vecteur de clonage et d'expression de l'interféron- γ , bactéries transformées et procédé de préparation de l'interféron- γ .

La présente invention concerne un procédé de préparation de l'interféron γ humain.

L'interféron γ (ci-après IFN- γ) est une glycoprotéine dotée in vitro d'une action anti-tumorale marquée. Il fait
5 l'objet de nombreuses recherches au niveau pharmaceutique. Pour assurer le développement de ce produit, il convient de pouvoir le préparer en quantité importante afin d'en diminuer le prix.

En mettant en oeuvre des techniques de génies génétiques on a pu décrire la préparation de l'IFN- γ par fermentation bactérienne notamment dans la demande de brevet
10 Européen 0077670.

Toutefois il ne semble pas que les rendements obtenus soient particulièrement intéressants, ainsi dans le brevet mentionné précédemment l'activité du milieu fermenté est de
15 $2,5 \times 10^5$ U IFN- γ /l ce qui est faible au niveau du rendement.

La présente invention a pour objet d'accroître le rendement de la fermentation par un facteur de 10 000 à 20 000, la quantité d'IFN- γ produit atteignant 20 % (du poids total)
20 des protéines bactériennes produites.

Pour ce faire la présente invention propose des nouveaux vecteurs.



Il s'agit de vecteur d'expression de la protéine mature de l'interféron γ dans les bactéries du type comportant le gène codant pour la protéine mature de l'interféron γ humain et les éléments plasmidiques assurant l'expression de ce gène caractérisé en ce que l'extrémité 5' de la séquence codant pour la protéine mature est la suivante :

5' ATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC 3'
 TAC ACG ATG ACA GTC CTA GGG
 Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro

Le début de la séquence originale et naturelle de IFN γ est la suivante (moins le codon ATG de départ) :

ATG TGT TAC TGC CAG GAC CCA

* en la comparant avec la séquence proposée :
ATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC

on note quatre changements de nucléotides qui conservent la composition de la protéine. Dans les exemples qui suivent on démontrera que ces changements permettent de multiplier par environ 10 000 le rendement en IFN- γ en particulier lorsque l'on utilise des vecteurs tels qu'ils seront décrits ci-après.

Les vecteurs selon la présente invention comportent outre le gène codant pour IFN avec une extrémité 5' comme indiquée précédemment :

- l'origine de répllication d'un plasmide bactérien;
- un promoteur, en particulier tout ou partie d'un promoteur du bactériophage λ : P_L , P_R ou P'_R ,
- une région codant pour l'initiation de la traduction incorporant l'ATG de l'extrémité 5' du gène de IFN- γ .

La présence d'une origine de répllication pour un plasmide est essentielle pour permettre la répllication du vecteur dans les cellules bactériennes correspondantes,

en particulier dans le cas de *E. coli* on utilisera, de préférence, l'origine de répllication du plasmide pBR322. Le plasmide pBR322 présente, en effet, l'avantage de donner un grand nombre de copies et ainsi d'augmenter la quantité

5

de plasmides produisant la protéine désirée. Parmi les promoteurs du bactériophage λ , on utilisera, de préférence, le promoteur principal de gauche noté λP_L . P_L est un promoteur puissant responsable de la transcription précoce de λ .

10

Il est également possible d'utiliser d'autres promoteurs du bactériophage λ , notamment le promoteur de droite, P_R ou le second promoteur de droite, P'_R .

15

Bien qu'il soit possible d'utiliser des séquences d'initiation de la traduction très variées, on préfère utiliser celle de la protéine cII du bactériophage λ qui sera nommée ci-après $\lambda cIIrbs$.

Comme cela sera démontré il est également possible d'utiliser de telles séquences synthétiques en particulier tout ou partie de la séquence :

20

ATAACACAGGAACAGATCTATG.

25

Le vecteur en cause comporte, en outre, de préférence une fonction d'antiterminaison de transcription codée par ex. par le gène N de λ noté λN . En présence du produit de transcription du gène N la transcription à partir de P_L se poursuit au-delà de la plupart des signaux stop.

30

Ceci écarte les problèmes posés par un arrêt prématuré de la transcription qui peuvent se produire lorsque les gènes étrangers clonés présentent de tels signaux stop. En outre, il a été démontré que l'expression à partir de P_L est améliorée dans un environnement N^+ .

Afin d'écarter les problèmes de toxicité et d'instabilité du système hôte-vecteur en cas de production en continu de grandes quantités d'une protéine étrangère, il est nécessaire de prévoir le contrôle de l'activité du promoteur en lui adjoignant tout ou partie d'un système d'expression inductible, en particulier thermo-inductible.

De préférence, le contrôle par la température de la synthèse de la protéine étrangère est effectué au niveau de la transcription au moyen d'un répresseur thermosensible codé dans la bactérie hôte, par exemple cI857, qui réprime l'activité de P_L à 28°C mais qui est inactivé à 42°C. Le répresseur agit sur l'opérateur O_L qui est adjacent au promoteur P_L . Bien que dans le cas précédent une partie du système d'expression thermo-inductible soit partie intégrante de la bactérie hôte, il est possible de prévoir que ce système fasse partie du vecteur lui-même.

Le vecteur en cause peut également comporter un gène de résistance à un antibiotique, par exemple l'ampicilline dans le cas de pBR322, mais d'autres gènes de résistance peuvent être utilisés, résistance à la tétracycline (Tet^r) ou au chloramphénicol (Cm^r).

L'incorporation d'un tel marqueur est nécessaire pour la sélection des bactéries contenant les transformants porteurs du plasmide selon l'invention pendant les expériences de clonage.

L'incorporation d'un gène de résistance permet d'augmenter la stabilité du plasmide en imposant une pression de sélection lors de la fermentation, et en outre facilite l'isolement des transformants.

Pour le clonage il est intéressant de disposer d'un système permettant de détecter l'insertion dans un plasmide d'un ADN étranger.

5 A titre d'exemple, il est possible de prévoir dans la zone de clonage le fragment N-terminal de la β -galactosidase de E. coli (lacZ') en le fusionnant avec la région d'initiation de traduction dérivée de λ cII, ce qui met la traduction du fragment α sous le contrôle des séquences de cII.

10 Le fragment α est complété par l'expression du fragment ω C-terminal codé dans l'hôte, ceci conduit à une activité β -galactosidase dans les cellules. Cette activité β -galactosidase produit des colonies bleues en présence d'un substrat chromophorique, le
15 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase.

A 28°C, le promoteur P_L est inactivé, le fragment α n'est pas synthétisé et les colonies demeurent blanches. Lorsque la température est amenée à 42°C, le promoteur P_L est activé, le fragment α est synthétisé
20 et les colonies virent au bleu.

L'insertion d'ADN étrangers dans les sites de clonage situés dans ce système de détection empêche la synthèse de la β -galactosidase et conduit donc à des colonies blanches aussi bien à 28°C qu'à 42°C.

25 Il est également possible de remplacer le gène lacZ' par d'autres gènes permettant une détection.

La présente invention concerne en outre les bactéries notamment les souches de E. coli transformées par les vecteurs selon l'invention par des techniques connues et dont certaines seront rappelées dans les exemples.

5 Enfin l'invention concerne un procédé de préparation de IFN- γ humain dans lequel on cultive sur un milieu de culture des bactéries transformées comme décrit précédemment et dans lequel on récupère ensuite l'IFN- γ formé.

10 Les milieux de culture mis en oeuvre sont connus de l'homme de métier et devront être adaptés à chaque souche cultivée. La culture sera de préférence effectuée en présence de l'antibiotique à l'encontre duquel la souche transformée est devenue résistante.

15 IFN- γ est séparé après éclatement des cellules par des techniques connues comme la séparation sur colonne d'affinité ou la chromatographie d'exclusion.

20 La présente invention comporte, bien entendu, d'autres aspects, notamment certains plasmides qui seront décrits dans les exemples ainsi que leurs mutants et dérivés et de façon générale les procédés de fermentation des bactéries transformées ainsi que l'IFN- γ ainsi obtenu.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront mieux compris à la lecture des exemples ci-après et des dessins ci-annexés sur lesquels :

- 25 - la figure 1 représente la stratégie permettant de préparer le plasmide pTG907,
 - la figure 2 représente la stratégie permettant de préparer le phage M13tg910,
 - la figure 3 représente la structure du phage M13tg910,
30 - la figure 4 représente la stratégie permettant de préparer le plasmide pTG908,
 - la figure 5 représente la séquence complète du gène codant pour IFN- γ isolé à partir de la banque,
 - la figure 6 représente la stratégie de préparation de
35 pTG909,

- la figure 7 représente la stratégie de préparation de pTG941,
- la figure 8 représente la stratégie de préparation de pTG951.

5 Il convient de remarquer que les différentes séquences de nucléotides figurant dans les dessins doivent être considérées comme faisant explicitement partie de la présente description, ces séquences n'ont pas été reproduites dans le corps du texte afin de ne pas l'alourdir inutilement.

1) Procédés généraux

10 a) Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans le cadre de la présente invention sont les suivantes :

. TGE900 qui est une souche de E. coli ayant les caractéristiques suivantes : su⁻F⁻his ilv bio (λ CI857 Δ Bam Δ HI)

15 . N6437, souche de E. coli ayant les caractéristiques suivantes : F⁻his ilv gal⁺ Δ 8proC⁺ : tn10 lac Δ m15 (λ CI857 Δ Bam Δ HI).

. Jm103 qui est une souche de E. coli ayant les caractéristiques suivantes : Δ (lac-pro) sup^E thi endA sbcB15 sttA rK⁻ nK⁺ / F¹ traD36 proAB⁺ lacI^a lacZ Δ m15.

20 Les souches mentionnées précédemment ont été utilisées parce qu'elles étaient disponibles, mais il est bien entendu qu'il est possible d'utiliser d'autres souches dans la mesure où elles présentent certaines caractéristiques essentielles qui sont rappelées dans le cours de la description détaillée.

25 b) Préparation des ADN

Des mini-préparations d'ADN de plasmides ou de phages M13 sont effectuées comme cela est décrit par Ish-Horowitz (référence 1) à la seule différence que l'ADN est précipité une seconde fois avec de l'éthanol avant d'être utilisé.

30

Les maxi-préparations sont effectuées comme cela est décrit dans la publication précédente, avec une purification complémentaire par un gradient de densité CsCl/bromure d'éthidium.

5 c) Techniques de clonages

Le traitement des ADN avec des enzymes de restriction est effectué, sauf indications contraires, en utilisant les conditions indiquées par le fabricant (New England Biolabs, Bethesda Research Laboratories et Boehringer Mannheim).

10 Lorsque cela est nécessaire, les phosphates des extrémités 5' sont éliminés en utilisant, soit une phosphatase alcaline bactérienne, soit une phosphatase d'intestin de veau, pendant 30 minutes à 37°C dans le tampon d'enzyme de restriction.

15 La réparation des extrémités cohésives utilisant la polymérase de Klenow (Boehringer Mannheim) est effectuée à 25°C pendant 15 minutes dans un mélange de 50 mMol. Tris HCl, pH 7,8, 5 mMol. MgCl₂, 10 mMol. de β-mercaptoéthanol, 0,4 mMol. de dNTPs avec l'enzyme et 10 à 200 µg/ml d'ADN.

20 La nucléase S₁ (Miles) est utilisée à 2 u/µg d'ADN à 25°C pendant 30 minutes dans un milieu 0,3 Mol. NaCl, 0,03 Mol. NaOAc, pH 4,8, 0,003 Mol. ZnCl₂.

25 Bal31 est utilisée selon le procédé de Panayotatos et al. (référence 2). Les ligations sont effectuées à 15°C (sauf lorsque cela est indiqué différemment) pendant 4 à 24 heures en utilisant de l'ADN ligase T₄

(Boehringer Mannheim) avec 100 mMol. de NaCl, 66 mMol. de Tris HCl, pH 7,5, 10 mMol. de MgCl₂, 0,5 mMol. de spermidine, 0,2 mMol. de EDTA, 2 mMol. de DTT, 1 mMol. d'ATP, 0,1 mg/ml de BSA et 5 à 50 µg/ml d'ADN.

5 Pour la ligation d'extrémités cohésives, on utilise environ 30 unités/ml de ligase. Pour la ligation des extrémités franches on utilise environ 100 unités/ml de ligase.

10 Entre les différentes réactions enzymatiques, des échantillons d'ADN sont extraits avec un mélange phénol/chloroforme puis précipités à l'éthanol. Lorsque cela est nécessaire, du tARN de E. coli ou de levures est utilisé comme entraîneur. Les adaptateurs moléculaires (Collaborative Research, Bethesda Research Laboratories, 15 New England Biolabs) sont préhybridés et utilisés en excès molaire de 10 à 50 fois pour les extrémités franches d'ADN utilisant les conditions de tampon décrites précédemment avec 100 unités/ml de ligase T₄ à 4°C pendant 15 heures. Lorsque l'on utilise des 20 adaptateurs non phosphorylés, les adaptateurs qui n'ont pas réagi sont éliminés directement après ligation par précipitation avec le tétrachlorhydrate de spermine (Hoopes et al. - référence 3).

25 Lorsque l'on utilise des adaptateurs phosphorylés, le mélange de ligation est tout d'abord extrait avec un mélange phénol/chloroforme puis précipité avec de l'éthanol avant coupure spécifique avec les enzymes de restriction appropriées puis précipitation avec le tétrachlorhydrate de spermine.

30 Les cellules bactériennes compétentes sont préparées puis transformées avec les plasmides ou transfectées par l'ADN de M13 selon les procédés décrits par Dagert et Ehrlich (référence 4).



EXEMPLE 1

La préparation du pTG908 implique tout d'abord la préparation d'un plasmide comportant :

- 5 - l'origine de réplication de pBR322,
- le gène de résistance à l'ampicilline de ce même plasmide(amp^R),
- le promoteur P_L et le gène λN.

1) Suppression du site PstI dans pBR322

10 Le plasmide de base utilisé est le plasmide pBR322 ; toutefois, celui-ci présente l'inconvénient d'avoir à l'intérieur du gène amp^R un site de restriction PstI, car un site de même nature sera utilisé par la suite dans la zone de clonage comme site unique de restriction. Il convient
15 donc de faire disparaître ce site de restriction PstI en utilisant un mutant du plasmide pBR322, le plasmide pUC8, dans lequel le gène de résistance à l'ampicilline ne présente pas de site de restriction PstI (ce site a été éliminé par mutation in vitro). pBR322 est commercialisé notamment par
20 Bethesda Research Laboratories et pUC8 est décrit dans l'article référencé 5.

Pour ce faire, on échange le fragment PvuI/PvuII de 1 669 bp de pBR322 avec le fragment analogue PvuI/PvuII du plasmide pUC8. Afin de réaliser cet échange les plasmides pBR322 et pUC8 sont traités successivement par PvuI, PvuII, puis circularisés par section d'une ligase.

On obtient ainsi le plasmide pTG902 qui ne présente plus de site de restriction PstI et qui a également perdu le site de restriction NdeI présent à l'origine sur pBR322 (non représenté sur la fig. 1). En outre, le plasmide pTG902 porte un fragment de 50 bp correspondant à la séquence lacI' dans lequel se trouve le site PvuII.

2) Insertion du promoteur P_L et du gène λN
et préparation du plasmide de pTG907

Le promoteur P_L et le gène λN sont isolés du plasmide pKC30 pour être insérés dans pTG902, le segment prélevé contient également l'opérateur O_L sur lequel agira le répresseur thermosensible cI850, comme cela sera décrit dans les essais. En outre, le procédé permet de supprimer les sites EcoRI et HindIII tout en conservant un site unique BamHI en aval du gène N pour pouvoir ensuite insérer λ CIrbs. Le plasmide de pKC30 est décrit dans la référence 6.

pTG902 est coupé en son site de restriction unique EcoRI et les extrémités 5' sortantes sont éliminées par traitement à la nucléase S_1 . Après une digestion avec BamHI, le fragment le plus important est purifié sur gel.

Le fragment portant le promoteur P_L et le gène λN est préparé de la même façon à partir de pKC30 en traitant successivement le plasmide par PvuI, la nucléase S_1 et BamHI. Les fragments, après purification sur gel, sont soumis à l'action de la ligase, ce qui conduit à la fusion EcoRI/PvuI et à la reconstitution du site BamHI.

Le mélange de ligation est utilisé pour transformer des cellules hôtes compétentes, TGE900, à 30°C. Cette souche contient le prophage λ délété, $\lambda cI857\Delta Bam\Delta HI$, qui fournit le répresseur de λ thermosensible, $cI857$, qui est nécessaire pour bloquer la transcription à partir de P_L .

Ceci est important car l'activité de P_L dans un milieu N^+ est létale compte tenu de la fonction d'antitermination de N .

Après analyse par enzymes de restriction, les clones contiennent des plasmides de structure correcte et sont ensuite testés pour leur manque de viabilité à 42°C.

L'un des plasmides obtenus, pTG906, est traité de façon à éliminer le segment PvuII-SalI de manière à supprimer les sites de restriction compris sur ce segment et afin de faire disparaître également les deux sites de restriction extrêmes. Pour ce faire, pTG906 est traité successivement avec SalI, la nucléase S_1 , PvuII et la ligase.

On obtient ainsi le plasmide pTG907 qui comporte l'ensemble des éléments évoqués au début de cette étape et, en outre, qui est $Pst^- Eco^- Hind^- Sal^- Ava^- Nde^- PvuII^-$. La synthèse de ce plasmide est représentée sur la figure 1.

3) Clonage de la région lacIrrbs

La seconde phase importante de la synthèse consiste à insérer la région lacIrrbs sous forme d'un fragment Aval/TaqI dans le début du
5 gène lacZ' (fragment α de la β -galactosidase) lequel a été cloné dans le phage M13 nommé M13tg110. Cette stratégie permet un test fonctionnel simple pour rbs, à savoir la production de la protéine lacZ' et, par conséquent, d'obtenir des plaques bleues en présence
10 d'IPTG et de Xgal ; ceci permet également un séquençage rapide de la construction en utilisant la méthode dite du didéoxy.

Dans le cours des expériences, différents dérivés du phage M13 seront mentionnés. Précédemment
15 on a mentionné le phage M13tg110 et dans la suite de la description on utilisera d'autres phages du même type dont la construction va être rappelée ci-après.

La construction de ces vecteurs est indiquée dans le tableau I ci-après sur lequel figurent les
20 références du phage de départ, la nature de l'enzyme de restriction avec laquelle il a été découpé, le traitement particulier qu'ont subi les fragments ainsi obtenus et la nature de l'insert qui a été fixé dans les sites ainsi révélés.

25 Le phage M13mp7 est commercialisé notamment par la société Bethesda Research Laboratories.

M13mp701 est obtenu à partir de M13mp7 par remplacement du fragment PstI/EcoRI à droite
(CTG CAG ... GAA TTC) par la séquence : CTG CAG CAA TTC.

30 Le principe de la construction est décrit dans le schéma suivant :

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CCG GAT CCG TCG ACC TGC AGC AAT TCA CTG GCC M13mp701

Bam HI

ATGACCATGATTACGAATTCCTCCG GATCCGTCGACCTGCAGCAATTCACCTGGCC
TACTGGTACTAATGCTTAAGGGGCCTAG GCAGCTGGACGTCGTTAAGTGACCCG

DNA polymerase

ATGACCATGATTACGAATTCCTCCGGATC GATCCGTCGACCTGCAGCAATTCACCTGGCC
TACTGGTACTAATGCTTAAGGGGCCTAG CTAGGCAGCTGGACGTCGTTAAGTGACCCG

Linker HindIII

ATGACCATGATTACGAATTCCTCCGGATCCCAAGCTTGG CCAAGCTTGGGATCCGTCGACCTGCAGCAATTCACCTGGCC
TACTGGTACTAATGCTTAAGGGGCCTAGGGTTTCAACC GGTTCGAACCTAGGCAGCTGGACGTCGTTAAGTGACCCG

HindIII

ATGACCATGATTACGAATTCCTCCGGATCCCA AGCTTGGGATCCGTCGACCTGCAGCAATTCACCTGGCC
TACTGGTACTAATGCTTAAGGGGCCTAGGGTTTCAACC ACCCTAGGCAGCTGGACGTCGTTAAGTGACCCG

T₄ DNA ligase

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CCG GAT CCC AAG CTT GGG ATC CGT CGA CCT GCA GCA ATT CAC TGG CC

Eco RI Bam HI Hind III Bam HI Sal I Pst I



TABLEAU I

<u>Nom</u>	<u>Phage parental</u>	<u>Site de clivage</u>	<u>Traitement</u>	<u>Insert</u>	<u>Phase de HindIII</u>	<u>Phase de BamHI</u>	<u>Phase de PstI</u>	<u>Complémentation de lac⁺/-</u>
M13mp701	M13mp7	Construction	D.R. Bentley		0	I	I	+
M13tg102	M13mp701	AccI	ADN polymérase	séquence HindIII (a)	I	I	I	+
M13tg110	M13mp701	AccI	S ₁ nucléase	séquence HindIII (a)	III	I	II	-
M13tg115	M13tg110	EcoRI	S ₁ nucléase	séquence BglII (b)	II	III	I	+

(a) Adaptateur de séquence HindIII phosphorylé CCAAGCTTGG

(b) Adaptateur de séquence BglII non phosphorylé CAGATCTG



Les protocoles d'utilisation des enzymes (restriction, ADN polymérase, T₄ADN ligase) sont ceux indiqués dans les notices des fournisseurs. Le "linker" HindIII est un oligonucléotide synthétique de séquence

5' CCAAGCTTGG 3' (Collaborative Research Inc., Waltham, Mass 02154, E.U.A.).

La région cIIrbs est isolée à partir d'un plasmide pOG11 (réf 7) qui contient un fragment de λ HaeIII/Sau3A qui s'étend du milieu du gène cro jusqu'au milieu de la région codant pour cII (cro et cII étant impliqués notamment dans la régulation de la lysogénie du bactériophage λ).

On prélève dans pOG11 le fragment AvaI/TaqI de 186 bp contenant la région cIIrbs et on le traite avec la polymérase Klenow. D'autre part, on traite le phage M13tg110 par BamHI puis par la polymérase de Klenow suivi d'un traitement à la phosphatase intestinale de veau. Les fragments obtenus sont soumis à l'action de la ligase T₄.

Un examen des séquences du fragment de pOG11 comportant la région cIIrbs et du phage M13tg110 permet de prévoir que l'insertion du fragment portant cIIrbs dans le site BamHI de M13tg110 doit conduire à l'obtention de plaques bleues après fermentation des bactéries transfectées compte tenu du fait que le gène lacZ' est en phase pour la traduction à partir de AUG du gène de cII, tandis que les plaques correspondant à la souche parentale M13tg110 sont blanches.

Les plaques bleues sont relevées puis les colonies sont sélectionnées par analyse de restriction enzymatique des mini-préparations et l'on vérifie ensuite par séquençage que la construction obtenue est correcte.

5 On obtient ainsi un clone résultant M13tg910 dont la structure globale est représentée à la partie inférieure de la Figure 2 et la structure détaillée est représentée à la figure 3.

10 On constate que l'insertion du fragment cIIrbs reconstruit en amont les sites BamHI et AvaI et en aval le site BamHI.

La traduction à partir de AUG de cII conduit à la fusion des 13 aminoacides terminaux de cII aux 8 aminoacides du NH₂ terminal de la protéine lacZ'.

15 4) Insertion du fragment λ cIIrbs dans le plasmide pTG907

La troisième étape de cette synthèse consiste à transférer le fragment cIIrbs/lacZ' du phage M13tg910 sur le plasmide vecteur pTG907 préparé précédemment.

20 Pour ce faire, il convient tout d'abord d'éliminer les sites EcoRI, BamHI et AvaI en amont de cIIrbs puis d'insérer un site BglII.

25 Dans ces conditions, cIIrbs peut être prélevé sous forme d'un fragment BglII-BglII et placé dans le site BamHI en aval du promoteur P_L et du gène λ N de pTG907.

30 Le phage M13tg910 est digéré avec EcoRI puis traité avec Bal31 puis ensuite par la polymérase de Klenow. Les fragments obtenus sont alors soumis à l'action de la ligase en présence d'adaptateurs BglII non phosphorylés. Le mélange de ligation obtenu est utilisé pour transformer des cellules compétentes JM103.

On sélectionne alors les plages bleues. Ces clones sont ensuite analysés afin de vérifier qu'ils contiennent le site BglII et qu'ils ne présentent plus de site EcoRI ou BamHI en amont. On obtient ainsi des clones tels que M13tg912 dont la structure est représentée sur la figure 4.

Le traitement par Bal31 a produit une délétion de 101 bp éliminant les sites EcoRI, BamHI et AvaI ; ainsi que les séquences de lac ATG et lac Shine/Dalgarno. Le site BglII introduit se trouve placé environ 100 bp en amont de l'ATG de cII et 10 bp en aval de P_{lac}.

Le fragment BamHI/SphI de pTG907, le fragment BglII/HgaI portant cIIrbs et lacZ' et l'adaptateur phosphorylé ont été préhybridés dans un rapport molaire de 1:2:1 puis traités avec la ligase T₄. Des aliquots sont utilisés pour transformer les cellules compétentes de la souche 6150 à 30°C.

Les cellules intéressantes sont identifiées en sélectionnant les transformants avec un fragment cIIrbs/lacZ' marqué au P³² et la construction obtenue est confirmée par une étude de restriction enzymatique.

Afin d'avoir une première indication montrant que les différents éléments du système d'expression se conduisent comme cela est désiré, le plasmide obtenu, pTG908, est transféré dans une souche hôte N6437 qui possède à la fois ci857 et le fragment ω de la β -galactosidase complétant le fragment α qui est codé par le plasmide.

Les transformants obtenus placés sur une boîte contenant IPTG + Xgal sont blancs à 28°C puis virent au bleu environ 30 minutes après lorsqu'on les transfère à 42°C.

EXEMPLE 2 : Sélection du clone de cDNA de IFN- γ humain

On réalise selon les procédés connus une banque de cDNA à partir des mARN de lymphocytes induits par des agents mitogènes.

Puis on sélectionne un clone comportant la séquence codant pour IFN- γ complet (figure 5) ce clone est dénommé pTG11.

IFN- γ est synthétisé sous forme d'un prépeptide dont la séquence signal de 20 amino-acides est scindée pour donner le polypeptide mature qui débute par la séquence cys-tyr-cys et couvre les amino-acides 21 à 166.

L'analyse de la séquence des nucléotides pour les sites de restriction révèle un site EcoRII à 8 bp en aval du départ de la protéine mature et un site Sau3A à 285 bp en aval du codon stop, ce qui permet d'isoler pratiquement toute la séquence codant pour la protéine mature sur un fragment EcoRII/Sau3A.

EXEMPLE 3 : Construction de pTG909 plasmide exprimant faiblement IFN- γ humain

La figure 6 schématise la préparation de pTG909.

On utilise tout d'abord une molécule d'adaptation synthétique qui permet :

a) d'effectuer la jonction entre les extrémités EcoRII et NdeI,

b) d'introduire les 8 bp manquantes par rapport à la séquence codant pour IFN- γ mature et,

c) de reconstituer le codon de départ ATG de cIIrbs de façon que la séquence codant pour la protéine IFN- γ mature soit traduite sans amino-acides fusionnés à l'exception de l'initiateur F-met.

Cet adaptateur est synthétisé chimiquement et sa constitution est représentée sur la figure 2.

pTG11 est mis en digestion avec EcoRII et Sau3A et pTG908 avec NdeI et BamHI.

5 Les fragments appropriés sont purifiés sur gel, mélangés avec une quantité équimolaire de l'adaptateur, préhybridés et ligés. Le mélange est utilisé pour transformer des cellules compétentes TGE900 et les transformants sont sélectionnés en hybridant un insert PstI de pTG11 "nick-
10 traduit" et marqué au p^{32} avec les transformants.

13 clones sont sélectionnés et contrôlés par cartographie et l'un d'eux pTG909 est vérifié par séquençage.

La mise en culture du clone de TG908 transformé par TG909 est effectuée sur un milieu LB avec 50 µg/ml Ampicilline jusqu'à
15 une densité optique $DO_{660} = 0,3$ ($\sim 10^8$ cellules/ml) et induite pendant 1 heure à 42°C. Les extraits sont préparés pour tester leur activité IFN-γ selon des procédés connus :

Les résultats montrent une activité de 10^5 unité/l de culture en IFN-γ. Le poids moléculaire de la protéine
20 d'environ 17000 dalton est en bon accord avec ce que l'on sait de IFN-γ.

Mais cette activité correspond à environ 0,001 % du contenu total en protéine de la cellule.

25 C'est ce résultat qui a amené à réétudier la structure fine des bases au voisinage de codon de départ et à proposer des mutations ponctuelles conservatrices permettant d'améliorer le rendement en IFN-γ.

EXEMPLE 4 : Construction du vecteur pTG941

pTG909 contient 2 sites NdeI, l'un au codon de départ de IFN- γ et l'autre 22 bp plus tard dans la séquence IFN- γ (voir figure 7).

5 La région entre ces sites qui est la région codant pour les 7 premiers amino-acides de IFN- γ a été éliminée par traitement avec NdeI et remplacée par un oligonucleotide synthétique qui est représenté sur la figure 7.

10 Cette réaction détruit le site NdeI aval et reconstitue le site NdeI amont tout en introduisant un site BamHI qui est unique.

Ce changement de base est conservateur, c'est-à-dire que la séquence d'amino-acide n'est pas altérée.

15 Les extraits obtenus dans les mêmes conditions que précédemment à partir de souche transformée par le plasmide pTG941, contiennent 2×10^9 U/l IFN- γ .

Ce résultat est 10 000 fois supérieur aux résultats obtenus avec pTG909 et correspond à 10 % du poids total des protéines cellulaires produites.

20 EXEMPLE 5 : Construction de pTG951

La figure 8 schématise la construction de pTG951 qui est un dérivé de pTG941 dans lequel un fragment contenant le cIIrbs a été remplacé par une séquence synthétique sur la base de la séquence de la région d'initiation de la traduction de l'opéron E. coli lac noté E. coli lac opéron rbs. Cet oligonucléotide synthétique a été inséré entre le site unique NdeI du codon de départ de la séquence codant pour IFN- γ et le site ClaI qui a été inséré au niveau du site HgaI dans le gène N. De ce fait par traitement avec NdeI et ClaI le plasmide pTG951 ne contient plus qu'un gène N tronqué (un codon stop en phase avec la traduction du gène N est placé immédiatement en amont du nouveau site rbs) et est dépourvu des terminateurs de

25

30

de transcription tL1 et tR1 présents dans pTG909 et pTG941.

5 Les extraits bactériens obtenus à l'aide de bactéries transformées par pTG951 conduisent à une production de 5×10^9 IFN- γ U/l de culture, ce qui correspond à 25 % du poids total des protéines cellulaires produites.

10 Le site rbs synthétique de pTG951 contient un site BglII unique immédiatement avant le codon de départ, il est donc possible de faire des dérivés de pTG951 par scission avec BglII suivi par diverses manipulations utilisant soit l'ADN polymérase I ou la nucléase S1. Ces dérivés présentent des variations dans la distance et les séquences entre la séquence de Shine/Dalgarno et
15 l'ATG. Mais aucun des plasmides ainsi préparé ne présente une activité supérieure au pTG951 lui-même.

Les principaux résultats sont rappelés dans le tableau ci-après :

<u>NOM</u>	<u>PROMOTEUR</u>	<u>RBS</u>	<u>SEQUENCE DE RBS ET JONCTION AVEC LA SEQUENCE IFN</u>	<u>UIFNY/l % PROTEINE</u>
PTG909	PL	cII	fmet cys tyr cys gln asp pro tyr TAAGGAAGTACTTACATATG TGT TAT TGC CAG GAC CCA TAT	10 ⁵ U NON DETECTE
PTG941	PL	cII	fmet cys tyr cys gln asp pro tyr TAAGGAAGTACTTACATATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC TAT 2 x 10 ⁹ U	>10 %
PTG951	PL	SYNTH (lac)	fmet cys tyr cys gln asp pro tyr CACAGGAACAGAGATCTATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC TAT 5 x 10 ⁹ U ----- BgIII	>10 %

TABLEAU

Bibliographie

1. Ish-Horowitz D. et Burke J.F., Nucl. Acids Res. 9,
2989-2998 (1981).
- 5 2. Panayotatos N. et Trong K., Nucl. Acids Res. 9,
5679-5688 (1981).
3. Hoopes B.C. et McClure R.R., Nucl. Acids Res. 9,
5493-5504 (1981).
4. Dagert M. et Ehrlich S.D., Gene, 23-28 (1979).
5. Vieira J. et Messing J., Gene 19, 259-268.
- 10 6. Shimatake H. et Rosenberg M., Nature, 292, 128-132,
(1981).
7. Oppenheimer A.B., Gottesman S. et Gottesman M., J. Mol.
Biol., 158, 327-346 (1982).

REVENDEICATIONS

1. Vecteur d'expression de la protéine mature de l'interféron γ dans les bactéries du type comportant le gène codant pour la protéine mature de l'interféron γ humain et les éléments plasmidiques assurant l'expression de ce gène caractérisé en ce que l'extrémité 5' de la séquence codant pour la protéine mature est la suivante :
- 5' $\overline{\text{ATG}}$ TGC TAC TGT CAG GAT CCC 3'
- TAC ACG ATG ACA GTC CTA GGG
- Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro
2. Vecteur de clonage selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte en outre :
- a) l'origine de réplication d'un plasmide bactérien,
 - b) un promoteur,
 - c) une région d'initiation de la traduction comportant le codon ATG de la séquence codant pour IFN- γ mature.
3. Vecteur selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comporte :
- a) l'origine de réplication d'un plasmide bactérien,
 - b) un promoteur du bactériophage λ , P_L , P_R ou P'_R ,
 - c) une région d'initiation de la traduction choisie parmi tout ou partie $\lambda cIIrbs$ ou une séquence synthétique placée sous le contrôle du promoteur du bactériophage λ .
4. Vecteur selon la revendication 2 caractérisé en ce que la région d'initiation de la traduction est $\lambda cIIrbs$.
5. Vecteur selon la revendication 2 caractérisé en ce que la région est constituée par tout ou partie de la séquence :

ATAACACAGGAACAGATCT $\overline{\text{ATG}}$.

6. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que le promoteur utilisé est le promoteur P_L .

5 7. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, une fonction d'antiterminaison de transcription.

8. Vecteur selon la revendication 7 caractérisé en ce que la fonction d'antiterminaison de transcription est le gène λN .

10 9. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comporte l'origine de répllication de pBR322.

15 10. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il comporte un gène codant pour la résistance à un antibiotique.

11. Vecteur selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comporte un gène de résistance à l'ampicilline.

12. Les plasmides vecteurs pTG941 et pTG951 ainsi que leurs mutants et dérivés.

20 13. Bactéries transformées par un vecteur selon l'une des revendications 1 à 12.

14. Bactéries selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il s'agit de E. coli.

25 15. Procédé de préparation d'interféron γ humain caractérisé en ce qu'on a cultivé sur un milieu de culture une bactérie selon l'une des revendications 13 et 14 et en ce que l'on isole IFN- γ humain obtenu après culture.

1/8

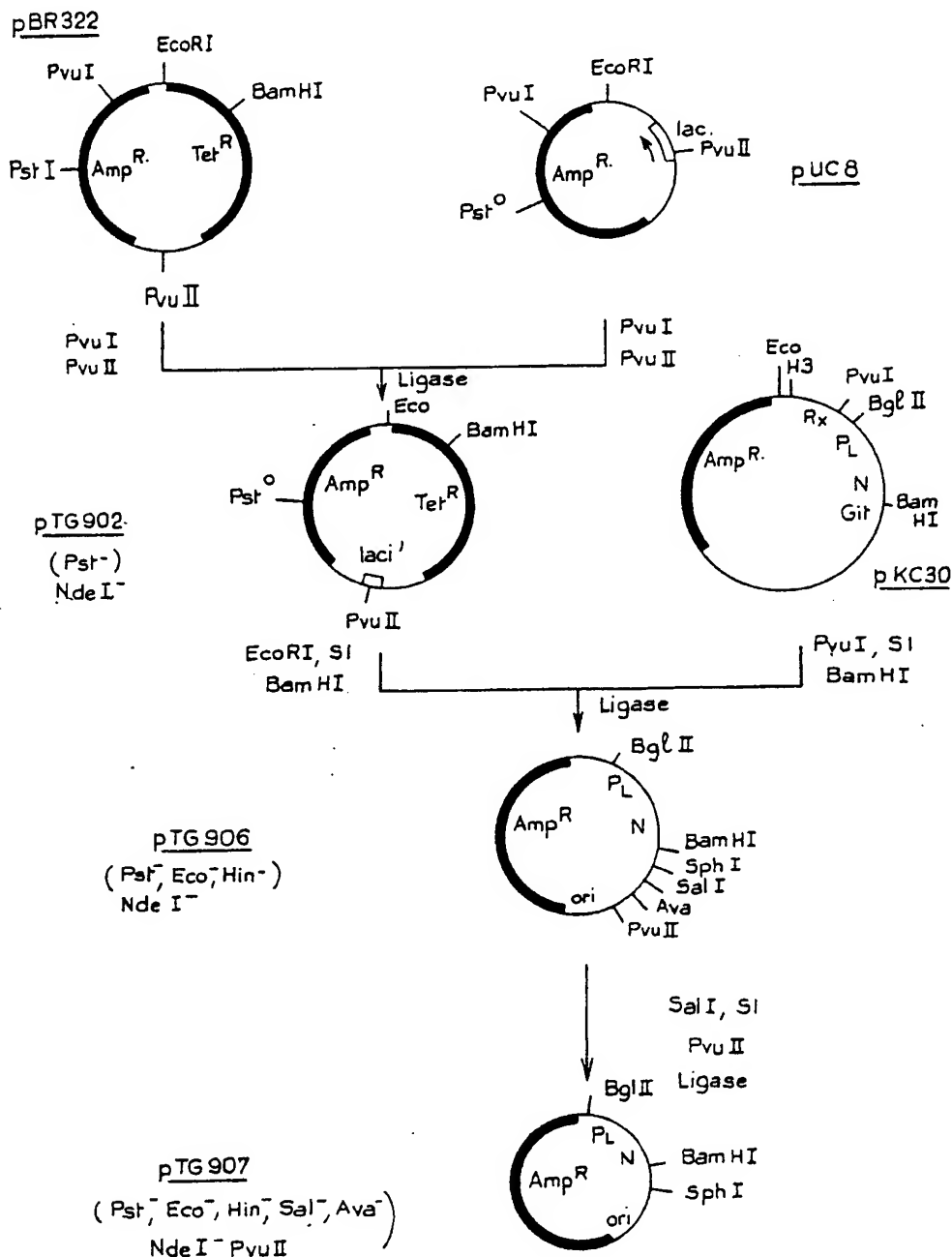


FIG.1

2/8

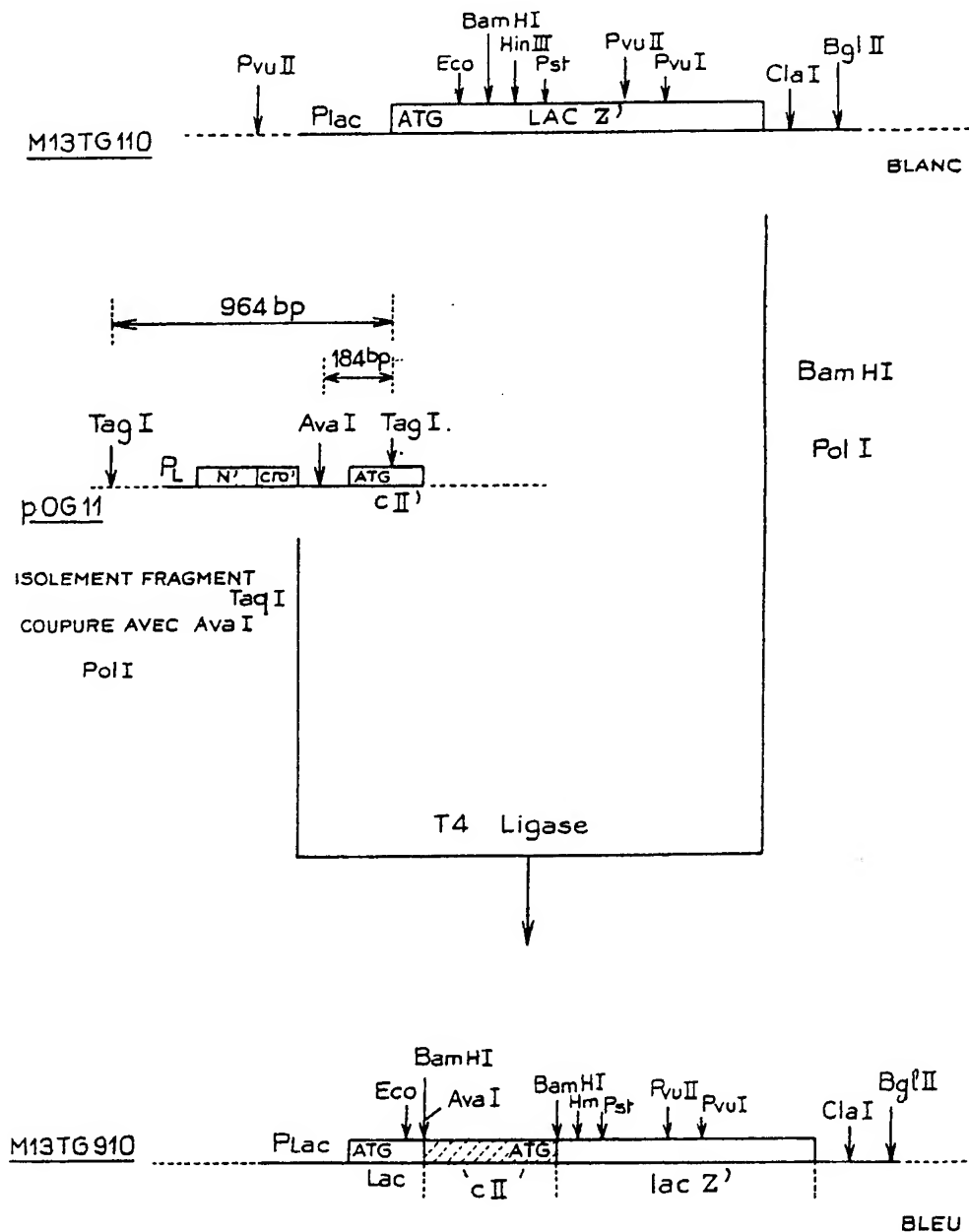


FIG. 2

3/8

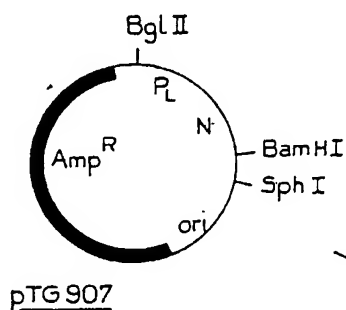
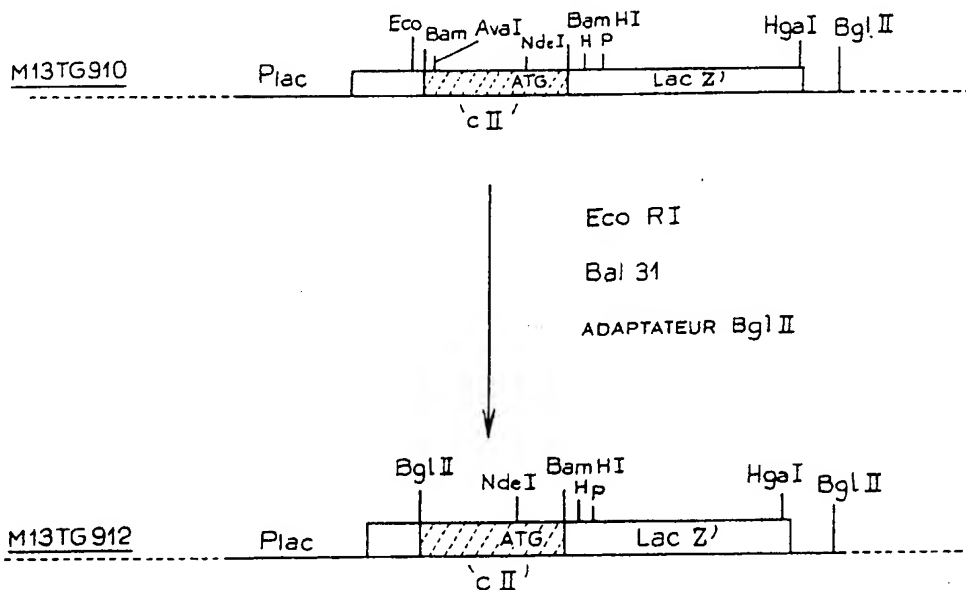
10	GAITTCGMA	20	CAACACATCA	30	ACAGATIT	40	CGCTCTGG	50	GGCAACAC	60	TTGCTGAC	70	TCCTCAGG	80	CCAGGGGG	90	AGAGAGTC	100	GGTCCGAC	110	TTCCCGTT	120	AGAGGCGG	130	CGTCTGCT	140	GGGAGGAC	150	CCGTTTGG	160	CGCTCTGG	170	GGGAGGAC	180	CCGTTTGG	190	GGGAGGAC	200	CCGTTTGG	210	GGGAGGAC	220	CCGTTTGG	230	GGGAGGAC	240	CCGTTTGG	250	GGGAGGAC	260	CCGTTTGG	270	GGGAGGAC	280	CCGTTTGG	290	GGGAGGAC	300	CCGTTTGG	310	GGGAGGAC	320	CCGTTTGG	330	GGGAGGAC	340	CCGTTTGG	350	GGGAGGAC	360	CCGTTTGG	370	GGGAGGAC	380	CCGTTTGG	390	GGGAGGAC	400	CCGTTTGG	410	GGGAGGAC	420	CCGTTTGG	430	GGGAGGAC	440	CCGTTTGG	450	GGGAGGAC	460	CCGTTTGG	470	GGGAGGAC	480	CCGTTTGG	490	GGGAGGAC	500	CCGTTTGG	510	GGGAGGAC	520	CCGTTTGG	530	GGGAGGAC	540	CCGTTTGG	550	GGGAGGAC	560	CCGTTTGG	570	GGGAGGAC	580	CCGTTTGG	590	GGGAGGAC	600	CCGTTTGG	610	GGGAGGAC	620	CCGTTTGG	630	GGGAGGAC	640	CCGTTTGG	650	GGGAGGAC	660	CCGTTTGG	670	GGGAGGAC	680	CCGTTTGG	690	GGGAGGAC	700	CCGTTTGG	710	GGGAGGAC	720	CCGTTTGG	730	GGGAGGAC	740	CCGTTTGG	750	GGGAGGAC	760	CCGTTTGG	770	GGGAGGAC	780	CCGTTTGG	790	GGGAGGAC	800	CCGTTTGG	810	GGGAGGAC	820	CCGTTTGG	830	GGGAGGAC	840	CCGTTTGG	850	GGGAGGAC	860	CCGTTTGG	870	GGGAGGAC	880	CCGTTTGG	890	GGGAGGAC	900	CCGTTTGG	910	GGGAGGAC	920	CCGTTTGG	930	GGGAGGAC	940	CCGTTTGG	950	GGGAGGAC	960	CCGTTTGG	970	GGGAGGAC	980	CCGTTTGG	990	GGGAGGAC	1000	CCGTTTGG	1010	GGGAGGAC	1020	CCGTTTGG	1030	GGGAGGAC	1040	CCGTTTGG	1050	GGGAGGAC	1060	CCGTTTGG	1070	GGGAGGAC	1080	CCGTTTGG	1090	GGGAGGAC	1100	CCGTTTGG	1110	GGGAGGAC	1120	CCGTTTGG	1130	GGGAGGAC	1140	CCGTTTGG	1150	GGGAGGAC	1160	CCGTTTGG	1170	GGGAGGAC	1180	CCGTTTGG	1190	GGGAGGAC	1200	CCGTTTGG	1210	GGGAGGAC	1220	CCGTTTGG	1230	GGGAGGAC	1240	CCGTTTGG	1250	GGGAGGAC	1260	CCGTTTGG	1270	GGGAGGAC	1280	CCGTTTGG	1290	GGGAGGAC	1300	CCGTTTGG	1310	GGGAGGAC	1320	CCGTTTGG	1330	GGGAGGAC	1340	CCGTTTGG	1350	GGGAGGAC	1360	CCGTTTGG	1370	GGGAGGAC	1380	CCGTTTGG	1390	GGGAGGAC	1400	CCGTTTGG	1410	GGGAGGAC	1420	CCGTTTGG	1430	GGGAGGAC	1440	CCGTTTGG	1450	GGGAGGAC	1460	CCGTTTGG	1470	GGGAGGAC	1480	CCGTTTGG	1490	GGGAGGAC	1500	CCGTTTGG
----	-----------	----	------------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	-----	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------

FIG-3

FEUILLE DE REMPLACEMENT



4/8



Bam HI
Sph I

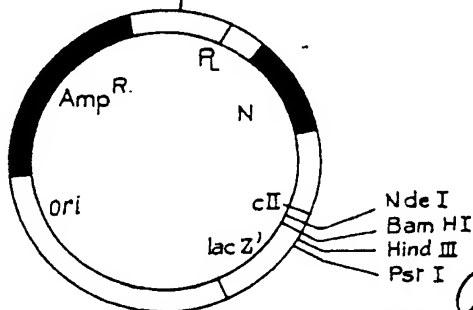
Bgl II
Hga I

Ligase + ATTTCATG

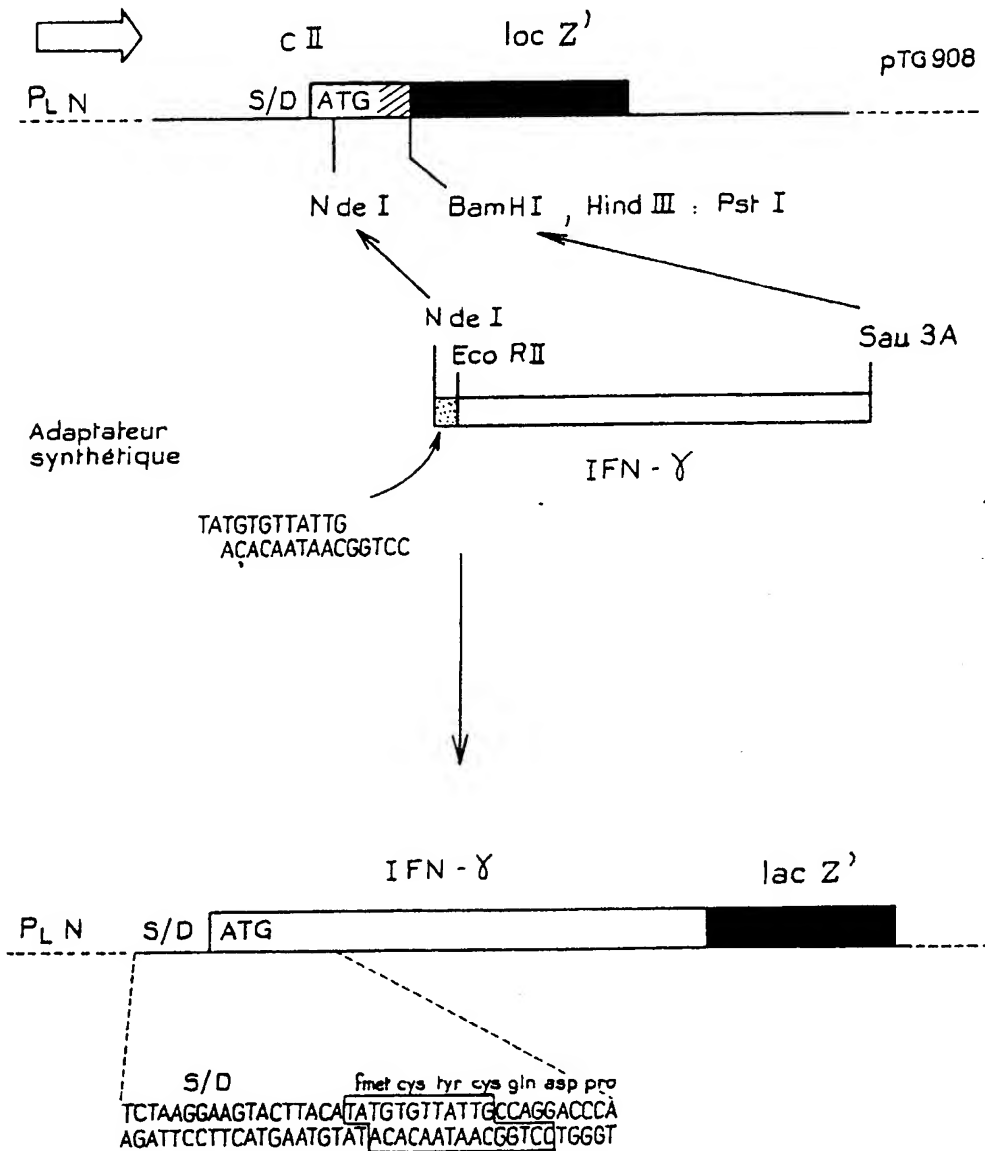
BglII

FIG. 4

pTG908



6/8

CONSTRUCTION DE PTG909FIG. 6

7/8

CONSTRUCTION DE PTG941

PTG909

IFN

MetCysTyrCysGlnAspProTyr
 TAAGGAAGTACTTACATATGTGTATTGCCAGGACCCATATG....
 NDEI NDEI

NDEI

+
 * * * * *
 TATGTGCTACTGTCAGGATCCC
 ACACGATGACAGTCCTAGGGAT

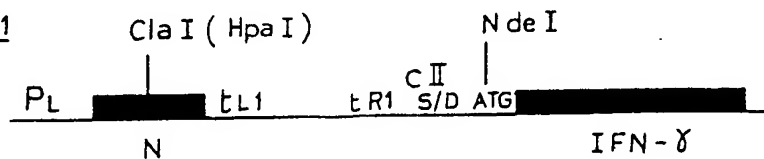
IFN

PTG941

MetCysTyrCysGlnAspProTyr
 TAAGGAAGTACTTACATATGTGCTACTGTCAGGATCCCTAT
 NDEI BAMHI

FIG. 7

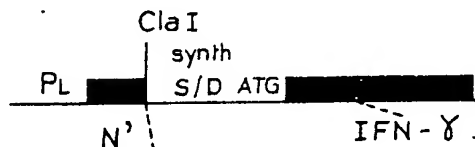
8/8

CONSTRUCTION DE PTG951PTG941

CLA I + NDE I

+

CGATAACACAGGAACAGATC
TATTGTGTCCTTGCTAGAT

PTG951

CGATAACACAGGAACAGATC *MetCysTyrCysGlnAspPro*
TATTGTGTCCTTGCTAGAT ACACGATGACAGTCCTAGGG

CLA I BGL II

FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 84/00287

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁸		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁴ C 12 N 15/00; C 12 P 21/02; C 12 N 1/20 // (C 12 N 1/20; C 12 R 1/19)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁶		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁴	C 12 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁶		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category ⁹	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
Y	EP, A, 0089676 (TAKEDA CHEMICAL IND.) 28 September 1983, see claims 1,3,5,6,8-20; page 4	1
Y	EP, A, 0094887 (TRANSGENE) 23 November 1983, see claims 1-23	1-3,6 4,7-11
A	---	
Y	EP, A, 0095350 (TANAKA) 30 November 1983, see claims 1-20	1,2
A	EP, A, 0041767 (BIOGEN) 16 December 1981, see claims 1-17	1,2
A	Gene, volume 13, 1981, Elsevier/North-Holland Biomedical Press; A. Honigman et al.: "Plasmid vectors for positive selection of DNA inserts controlled by the lambda rho L promoter, repressor and antitermination function", pages 289-298, see the whole document	1,2
P,Y	EP, A, 0099084 (HOFFMANN-LA ROCHE) 25 January 1984, see claims 1-30	1,2,3,6
P,Y	EP, A, 0110044 (TAKEDA CHEMICAL IND.) 13 June 1984, see claims 1-15	1,2
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁴</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"d" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ³	Date of Mailing of this International Search Report ³	
11 March 1985 (11.03.85)	01 April 1985 (01.04.85)	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ¹⁰	
European Patent Office		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/FR 84/00287 (SA 8357)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 22/03/85

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0089676	28/09/83	AU-A- 1274483	29/09/83
EP-A- 0094887	23/11/83	FR-A- 2526661	18/11/83
		WO-A- 8304052	24/11/83
EP-A- 0095350	30/11/83	AU-A- 1482483	08/12/83
EP-A- 0041767	16/12/81	EP-A- 0041313	09/12/81
		JP-A- 57014599	25/01/82
		AU-A- 6897881	10/12/81
		EP-A- 0040922	02/12/81
		AU-A- 7045581	10/12/81
EP-A- 0099084	25/01/84	JP-A- 59028479	15/02/84
EP-A- 0110044	13/06/84	WO-A- 8402129	07/06/84

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 84/00287

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB ⁴ : C 12 N 15/00; C 12 P 21/02; C 12 N 1/20 // (C 12 N 1/20; CIB : C 12 R 1/19)		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	C 12 N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
Y	EP, A, 0089676 (TAKEDA CHEMICAL IND.) 28 septembre 1983, voir revendications 1,3,5,6,8-20; page 4 --	1
Y	EP, A, 0094887 (TRANSGENE) 23 novembre 1983, voir revendications 1-23 --	1-3,6 4,7-11
A	--	
Y	EP, A, 0095350 (TANAKA) 30 novembre 1983, voir revendications 1-20 --	1,2
A	EP, A, 0041767 (BIOGEN) 16 décembre 1981, voir revendications 1-17 --	1,2
A	Gene, volume 13, 1981, Elsevier/North-Holland Biomedical Press; A. Honigman et al.: "Plasmid vectors for positive selection of DNA inserts controlled by the lambda rho L promoter, repressor and antitermination function", pages 289-298; voir le document en entier --	1,2
	./.	
<p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou le théorème constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
11 mars 1985	01 AVR. 1985	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	G.L.M. Kruidenberg	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS : ¹⁴ (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁴ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
P,Y	EP, A, 0099084 (HOFFMANN-LA ROCHE) 25 janvier 1984, voir revendications 1-30	1,2,3,6

P,Y	EP, A, 0110044 (TAKEDA CHEMICAL IND.) 13 juin 1984, voir revendications 1-15	1,2

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF

A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO. PCT/FR 84/00287 (SA 8357)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus. Lesdits membres sont ceux contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 22/03/85

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
EP-A- 0089676	28/09/83	AU-A- 1274483	29/09/83
EP-A- 0094887	23/11/83	FR-A- 2526661 WO-A- 8304052	18/11/83 24/11/83
EP-A- 0095350	30/11/83	AU-A- 1482483	08/12/83
EP-A- 0041767	16/12/81	EP-A- 0041313 JP-A- 57014599 AU-A- 6897881 EP-A- 0040922 AU-A- 7045581	09/12/81 25/01/82 10/12/81 02/12/81 10/12/81
EP-A- 0099084	25/01/84	JP-A- 59028479	15/02/84
EP-A- 0110044	13/06/84	WO-A- 8402129	07/06/84